

PENYISIPAN GEN FITASE PADA TANAMAN TEBU cv. PA 175 MELALUI *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (pBinPI-IIEC)

Phytase Gene Insertion in Sugarcane Plants cv. PA 175 through Agrobacterium tumefaciens GV 2260 (pBinPI-IIEC)

Oleh:

Susiyanti¹, G.A. Wattimena², M. Surahman², A. Purwito²,
dan Dwi Andreas Santosa^{3*}

¹ Staf Pengajar Jurusan Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Sultan Ageng Tirtayasa, Serang-Banten

² Staf Pengajar Fakultas Pertanian IPB, Bogor

³ Staf Pengajar Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan,
IPB, Bogor, Telp: 0251-422372; Fax: 0251-629358;
E-mail: dsantosa@indo.net.id (* Penulis untuk korespondensi)

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is one of importance crop grown in marginal in Indonesia. Phosphorus (P) is critical to the growth and development of plant in the marginal land. P is stored in plant as phytic acid (myo-inositolhexakisphosphate). Phytic acid is hydrolyzed by the activity of phytases to yield inositol and free phosphate. Genetic transformation of sugarcane with phytases gene holds promise to provide enough P during period of rapid cell division and growth of plant. Plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, has become the most used method for the introduction foreign genes into plant cells and the sub sequens regeneration of transgenic plant. The selection and regeneration of embryogenic callus of transformed plant was done on MS medium containing kanamycin. The main objective of this study were: (1) To find the best kanamycin concentration for selectable marker; (2) Insert phytase gen into varieties of sugarcane (cv. PA 175) through *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (pBinPI-IIEC); and (3) To analyze of intregated transgene into genom of sugarcane using PCR method. Result of the experiment showed: (1) kanamycin selectable marker lethal doses for transformed sugarcane calli: 100 mg l⁻¹; (2) Efficiency transformation of putative transgenic line was cv. PA 175= 24 %; (3) The first culture of transformed calli become 24 (Triton cv.), 18 (PSJT 94-41 cv.), and 30 (PA 175 cv.) putative plants; the second sub culture of putative eksplant regenerate become new plant: 380 (PA 175 cv.) plants. (4) Analyzed of integrated phytase gene was proven by appearance of 900 bp of PCR band (5) transgenic plants (cv. PA 175) with highest activities respectively: 45 %; with medium phytase activity: 27 %, and low phytase activity: 27 % from total of sample. Non transgenic plants, most of sample show low phytase activity respectively: 100 % , noneh show medium - hight activy of phytase.

Key words: *Sugarcane, transformation, phytase, Agrobacterium tumefaciens*

PENDAHULUAN

Guna menunjang produksi tebu, diperlukan unsur hara P yang cukup tersedia bagi tanaman. Persoalan yang dihadapi

berkaitan dengan ketersediaan P, yaitu tidak semua P tanah dapat segera tersedia bagi tanaman karena umumnya P tersebut berada dalam bentuk terikat yang sukar untuk digunakan tanaman (Greiner, 2005). Bentuk

terikat tersebut dapat dimanfaatkan oleh tanaman, terutama jika tanaman memiliki enzim *fitase* yang cukup yang dapat menghidrolisa asam fitat (Keruvuo *et al.*, 2000; Greiner, 2005), namun tidak semua tanaman dapat menghasilkan *fitase* yang cukup.

Upaya peningkatan aktivitas *fitase* dapat dilakukan baik dengan pemuliaan maupun rekayasa genetika. Guna menunjang program pemuliaan untuk menghasilkan tanaman unggul maka ketersediaan plasma nutfah sebagai sumber keragaman sangat diperlukan. Permasalahannya adalah aktivitas tebu secara alami sangat rendah, sehingga membuka peluang pemanfaatan gen-gen yang memiliki nilai penting yang berasal dari spesies lain. Selain itu, upaya perbaikan genetik tebu dengan pemuliaan konvensional memerlukan waktu yang panjang karena sebagian besar kultivar tebu modern merupakan hibrida interspesifik yang memiliki tingkat ploidi yang tinggi, sehingga memiliki karakteristik genetik yang kompleks serta fertilitas rendah (Gilbert *et al.*, 2005). Berdasarkan permasalahan di atas, rekombinasi genetik dengan teknik rekayasa genetika melalui penyisipan gen yang dikehendaki (seperti gen *fitase*) ke dalam tebu, mempunyai prospek yang lebih menjanjikan.

Guna menyisipkan gen asing, maka dapat dilakukan transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* yang telah terbukti memiliki tingkat keberhasilan dan kestabilan gen yang tinggi. Menurut Riva *et al.* (1999), transformasi dengan mediasi *Agrobacterium* dapat mengintroduksi sejumlah kecil kopi dari gen asing, tetapi memiliki efisiensi kestabilan transformasi yang lebih baik bila dibandingkan dengan *particle bombardment* ataupun secara elektroforasi. Sejalan dengan perkembangan teknologi, efisiensi transformasi telah ditingkatkan melalui penggunaan asetosiringon untuk tanaman monokotil, pelukaan jaringan target yang sesuai, dan perbaikan sistem seleksi kanamisin (Pardal, 2002). Gen *fitase* yang disisipkan ke dalam tebu diharapkan mampu

menghasilkan enzim yang dapat mengubah fitat menjadi P yang dapat digunakan oleh tumbuhan.

Setelah proses transformasi selesai, maka perlu dilakukan seleksi awal dalam media tertentu untuk menyeleksi eksplan yang berhasil ditransformasi dengan yang tidak. Kanamisin kerap digunakan sebagai penanda seleksi dalam kegiatan transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Konsentrasi kanamisin sebagai penanda seleksi yang digunakan Ananda (2004) adalah 100 mg l⁻¹ pada kultivar tebu cv. PSJT 94-33, cv. BR 194. Respon tiap kultivar tebu terhadap pemberian kanamisin sebagai *selectable marker* adalah berbeda, termasuk untuk tebu cv. PA 175.

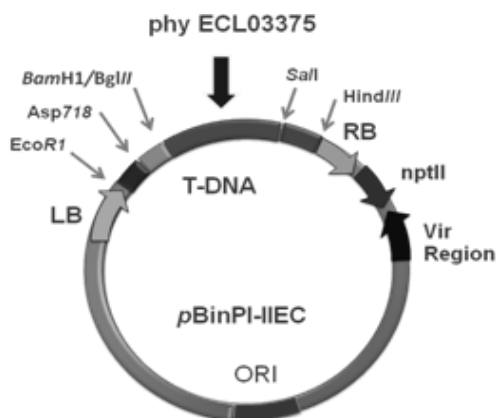
Setelah penyisipan gen berhasil dilakukan, maka sangatlah penting untuk mendeteksi keberadaan *transgene* tersebut. Pendeteksian gen dapat dilakukan dengan PCR yang merupakan teknik perbanyakan molekul DNA dengan ukuran tertentu secara enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu (Sulandari dan Zein 2003). PCR mampu menggandakan fragmen DNA yang panjangnya lebih dari 15 kb menjadi 10⁸ kali. Pendeteksian gen khusus, dapat dilakukan dengan menggunakan primer spesifik. Keuntungan penggunaan PCR, antara lain adalah prosesnya lebih cepat, DNA yang dibutuhkan hanya dalam jumlah yang sangat sedikit, dapat dilakukan pada tahap awal, serta teknik isolasi DNA yang sederhana. Diharapkan dengan penggunaan PCR ini, dapat dideteksi apakah gen *fitase* asal bakteri yang ditransformasikan telah berhasil masuk atau tidak ke dalam genom tanaman tebu.

Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk: (1) menguji konsentrasi kanamisin yang tepat sebagai penanda yang akan digunakan dalam proses seleksi tebu transforman; (2) mempelajari dan mengkaji proses transformasi kultivar tebu yang disisipi gen *fitase* melalui *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (*pBinPI-IIEC*); dan (3) mendeteksi integrasi gen *fitase* dalam genom tebu dengan analisis PCR.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2005 hingga September 2007; di Laboratorium Bioteknologi-Kultur Jaringan-AGR, IPB; Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi PPLH, IPB; Laboratorium Saraswanti Indo-Genetech (SIG), Bogor; serta Laboratorium. Indonesia Center for Biodiversity and Biotechnology (ICBB), Bogor.

Kalus tebu yang digunakan adalah tebu cv. PA 175 ditransformasi dengan *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 dan telah disisipi gene cassette *pBinPI-II EC*. Gene cassette tersebut dihasilkan melalui kerjasama dengan *Federal Research Center for Nutrition, Center for Molecular Biology, Germany* dan Fakultas Pertanian IPB.



Gambar 1. Konstruksi plasmid pBinPI-II EC

A. Uji ketahanan kalus original dalam media kanamisin

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Konsentrasi kanamisin yang digunakan sebagai selectable marker (K) dengan taraf: 75 mg l⁻¹ (K₁), 100 mg l⁻¹ (K₂), 125 mg l⁻¹ (K₃), dan 150 mg l⁻¹ (K₄).

Kalus *in vitro* dari masing-masing kultivar ditumbuhkan pada media MS-1 yang ditambahkan kanamisin dengan berbagai konsentrasi dan diamati perkembangannya selama 4 minggu.

B. Transformasi gen fitase

Bahan-bahan yang digunakan adalah kalus tebu (cv. PA 175) usia 6 minggu. Transformasi dilakukan berdasarkan metode modifikasi Santosa *et al.*, (2004, 2005) yang selanjutnya dikulturkan pada media MS + kanamisin 150 ppm selama 4 minggu dengan penyinaran 3000 lux. Kalus yang lolos pada

media seleksi kanamisin selanjutnya dipindahkan pada media inisiasi tunas (MS + 0,1 mg/l kinetin + 1,0 mg/l BAP).

C. Analisis integrasi gen fitase hasil transformasi dengan teknik PCR

Sampel yang diambil untuk analisis integrasi gen fitase hanya pada plantlet yang memiliki klorofil. DNA total tanaman diisolasi dengan metoda Santosa *et al.*, (2004, 2005). Primer spesifik gen fitase yang digunakan untuk PCR adalah EC1 dan EC3 (EC1: 5' CGA TTA GCG GAT AGA GCC TG3'; dan EC3: 5'GAT TAT TGC CCC ACC GCG CC3'). Campuran reaksi sebanyak 20 µL yang terdiri atas 10 µL Master mix; 1 µL masing-masing primer spesifik untuk gen fitase (1 µL EC1 dan 1 µL EC 3); 2 µL DNA dari tanaman transgenik dan kontrol dan 6 µL ddH₂O. Reaksi dijalankan sebanyak 35 siklus pada mesin PCR merk Eppendorf. Reaksi PCR diatur sebagai berikut: denaturasi pada 94°C

selama 30 detik, *annealing* pada 60°C selama 1 menit, *extension* pada 72°C selama 3 menit, *final extension* 72°C selama 10 menit.

Sebanyak 5 µL DNA hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarose 2 % selama 30 menit menggunakan buffer 1X TAE pada tegangan listrik 100 volt. Hasil elektroforesis diamati dengan merendam gel pada larutan *ethidium bromida* 10 µg/ml selama 10 menit dan diekspose di bawah sinar UV menggunakan UV transiluminator. Keberhasilan transformasi ditunjukkan oleh adanya pita DNA hasil amplifikasi dengan primer spesifik gen fitase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji ketahanan kalus original dalam media kanamisin

Seleksi terhadap sel-sel yang ditransformasi merupakan faktor kunci dalam pengembangan metode transformasi yang sukses. Data Tabel 1 menunjukkan respon 3 kultivar tebu terhadap pemberian kanamisin dalam media seleksi. Kalus yang ditransformasi dapat bertahan dalam media seleksi kanamisin 150 mg l⁻¹. Setelah dikulturkan selama 2 minggu dalam media kanamisin pada media 100 mg l⁻¹, kalus tebu cv. PA 175 tidak dapat bertahan hidup. Bila konsentrasi ditingkatkan menjadi 125-150 mg l⁻¹ Kanamisin, maka kalus tidak dapat bertahan hidup dalam jangka waktu 2 minggu. Matinya kalus tebu tersebut karena tidak memiliki gen *nptII* yang menghasilkan unsur neomycin phosphatase yang menghasilkan kanamisin. Racun yang disebabkan oleh antibiotik kanamisin dapat

mengganggu fungsi ribosom dan mengakibatkan kematian sel.

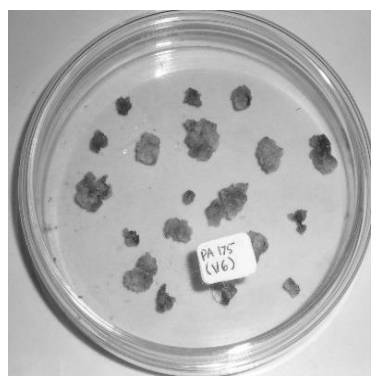
Konsentrasi kanamisin 100 mg l⁻¹ yang ditambahkan dalam media seleksi dapat digunakan sebagai penanda untuk seleksi setelah transformasi. Diharapkan dengan konsentrasi tersebut dapat membedakan antara jaringan yang telah berhasil ditransformasi dan yang tidak. Pemberian kanamisin sebagai penanda seleksi pada kegiatan transformasi tebu telah dilakukan Chen *et al.*, (1988) dengan pemberian 80 µg ml⁻¹ kanamisin (setara dengan 80 mg ml⁻¹). Jaringan yang ditransformasi dapat mengekspresikan gen aminoglycoside-phosphotransferase APH (3') II.

B. Transformasi gen fitase

Kalus cv. PA 175 berhasil ditransformasi dengan gen *fitase* melalui *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (*pBinPI-IIEC*) dan dapat bertahan dalam media seleksi kanamisin selama 4 minggu. Persentase kalus yang hidup dalam media kanamisin secara berturut turut adalah 82%. Ketahanan tersebut diperoleh karena pada *gene cassette* yang disisipkan mengandung gen *neomycin phosphotransferase (nptII)*. Bila kalus tebu yang telah ditransformasi memiliki gen *nptII*, maka akan menyebabkan terjadinya detoksifikasi kanamisin melalui transfer gugus fosfat dari ATP ke molekul kanamisin yang mengakibatkan detoksifikasi antibiotik. Kondisi ini menyebabkan fungsi ribosom tidak terhambat, karena dicegah reaksinya dengan ribosom. Menurut Wilkins dan Dons (1993), agen seleksi (seperti: kanamisin) dapat menghambat metabolisme sel.

Tabel 1 Data rata-rata persentase kalus hidup dalam media kanamisin.

cv. PA 175 (V3)	
Persentase kalus hidup (%) minggu ke-1	
Kan 75 mg ^l ⁻¹	90.00
Kan 100 mg ^l ⁻¹	70.00
Kan 125 mg ^l ⁻¹	30.00
Kan 150 mg ^l ⁻¹	15.00
Rataan kultivar	51.25
Persentase kalus hidup (%) minggu ke-2	
Kan 75 mg ^l ⁻¹	70.00
Kan 100 mg ^l ⁻¹	10.00
Kan 125 mg ^l ⁻¹	0.00
Kan 150 mg ^l ⁻¹	0.00
Rataan kultivar	20.00
Persentase kalus hidup (%) minggu ke-3	
Kan 75 mg ^l ⁻¹	45.00
Kan 100 mg ^l ⁻¹	0.00
Kan 125 mg ^l ⁻¹	0.00
Kan 150 mg ^l ⁻¹	0.00
Rataan kultivar	11.25
Persentase kalus hidup (%) ^{*)} minggu ke-4	
Kan 75 mg ^l ⁻¹	65.00 b
Kan 100 mg ^l ⁻¹	0.00 d
Kan 125 mg ^l ⁻¹	0.00 d
Kan 150 mg ^l ⁻¹	0.00 d
Rataan kultivar	16.25
Linear	**
Kuadratik	**



Gambar 2. Kalus tebu cv PSA 175 hasil tranformasi (usia 4 minggu) yang dikulturkan dalam media seleksi kanamisin.

Seleksi dari sel atau jaringan transgenik seringkali bias. Tanaman transgenik seharusnya dapat mengekspresikan *selectable marker gene*

melalui jaringannya. Banyak ditemukan kasus dimana dalam proses integrasi struktur lokus transgen, tidak sempurna menyisipkan *selectable marker gene* secara lengkap ke dalam genom tanaman, sehingga tidak dapat ditranskripsi atau menyebabkan *gene silencing*. Selain itu, juga terdapat kemungkinan terjadinya penyusunan ulang struktur lokus sehingga bisa hilang saat diseleksi (Somers *et al.*, 2004).

Kalus yang mampu tumbuh dan berkembang dalam media seleksi kanamisin menandakan bahwa jaringannya mampu mendetoksifikasi kanamisin yang terdapat dalam media sehingga tidak menjadi racun (Gambar 2). Ini dapat dijadikan petunjuk awal bahwa gen yang diintroduksi terdapat dalam genom tanaman. Pembuktian selanjutnya dilakukan dengan menggunakan PCR.

Cukup banyak kalus yang dapat bertahan hidup dalam media seleksi, tetapi tidak seluruhnya memiliki kemampuan untuk beregenerasi. Kemampuan beregenerasi kalus setelah transformasi akan sangat menentukan jumlah plantlet yang dihasilkan. Guna mengetahui keberhasilan metode regenerasi dan transformasi yang digunakan, maka dapat dihitung efisiensi regenerasi dan efisiensi transformasi. Efisiensi regenerasi didefinisikan dengan jumlah kalus yang beregenerasi dibandingkan dengan jumlah kalus di awal media regenerasi. Efisiensi transformasi didefinisikan sebagai jumlah kalus yang beregenerasi dibandingkan dengan jumlah kalus yang diinfeksi (Maftuhah, 2003). Efisiensi regenerasi tebu transforman cv. PA 175 30 %. Tunas yang terbentuk dari 24 kalus tebu cv. PA 175 beregenerasi menjadi 380 tunas. Beberapa tunas pada awalnya dapat tumbuh baik, tetapi setelah disubkulturkan beberapa kali ada yang bertahan hidup dan ada yang mati (Tabel 2).

Efisiensi transformasi pada penelitian ini 24 %. Efisiensi transformasi ditentukan oleh beberapa faktor, seperti jenis jaringan

yang diinfeksi, vektor yang digunakan, serta kondisi kultur. Sistem regenerasi yang tepat dari jaringan tanaman yang ditransformasi membuka peluang untuk memperoleh tanaman transgenik. Penggunaan kalus sebagai target jaringan yang disisipkan gen fitase bakteri sangat tepat, karena kalus merupakan sekumpulan sel yang aktif membelah. Kalus memiliki kemampuan dalam beregenerasi dan multiplikasi lebih baik dibandingkan dengan jaringan lain. Hal ini sejalan dengan pendapat dari Somers *et al.*, (2004), bahwa dalam transformasi digunakan jaringan tanaman yang dapat diregenerasikan sebagai sumber target totipotensi sel, serta diferensiasi sel dengan terlebih dahulu melalui tahapan seleksi dan regenerasi.

Plantlet transgenik putatif yang dihasilkan menunjukkan variasi warna yaitu albino, kuning, hijau muda, hijau, belang hijau putih pada tebu cvPA 175 (Gambar 3). Variasi pada tanaman tebu dapat disebabkan adanya perubahan urutan nukleotida dan struktur kromosom. Gen-gen yang disisipkan melalui transformasi menggunakan *A. tumefaciens*, secara normal akan bergabung dalam genom inti secara acak, sehingga terjadi perubahan urutan pasangan basa (Naik 2001; Nasir 2001).

Menurut Skinner *et al.*, (2004), kultur jaringan dapat menyebabkan variasi somaklonal juga sekaligus terjadi perubahan karena integrasi gen asing akibat transformasi. Plantlet-plantlet tebu tersebut telah berhasil disisipi transgen (fitase bakteri) melalui kegiatan transformasi yang dibuktikan dengan lolos tumbuh dalam media seleksi kanamisin. Jadi disini, diduga (putatif) bahwa tanaman yang hidup sesudah seleksi dengan kanamisin adalah hasil transformasi. Guna membuktikan hal tersebut, harus diuji lanjut dengan analisis gen fitase.

Tabel 2. Jumlah dan persentase kalus resisten, jumlah kalus beregenerasi, efisiensi regenerasi, efisiensi tranformasi pada tanaman tebu.

Peubah yang diamati	cv. PA 175
Jumlah kalus yang diinfeksi	123
Jumlah kalus yang resistensi terhadap kanamisin ^{*)}	101
Persentase kalus resisten (%)	(101/123) 82%
Jumlah kalus T ₀ beregenerasi ^{**)}	30
Jumlah tunas T ₁ ^{**)}	380
Tunas T ₁ albino ^{**) :}	145
Tunas T ₁ yang berwarna kuning dan hijau muda ^{**) :}	119
Tunas T ₁ belang putih ^{**) :}	29
Tunas T ₁ berwarna hijau ^{**) :}	87
% Tunas T ₁ berwarna hijau	(87/380) 23%
Efisiensi regenerasi (%)	(30/101) 30 %
Efisiensi transformasi	(30/123) 24 %

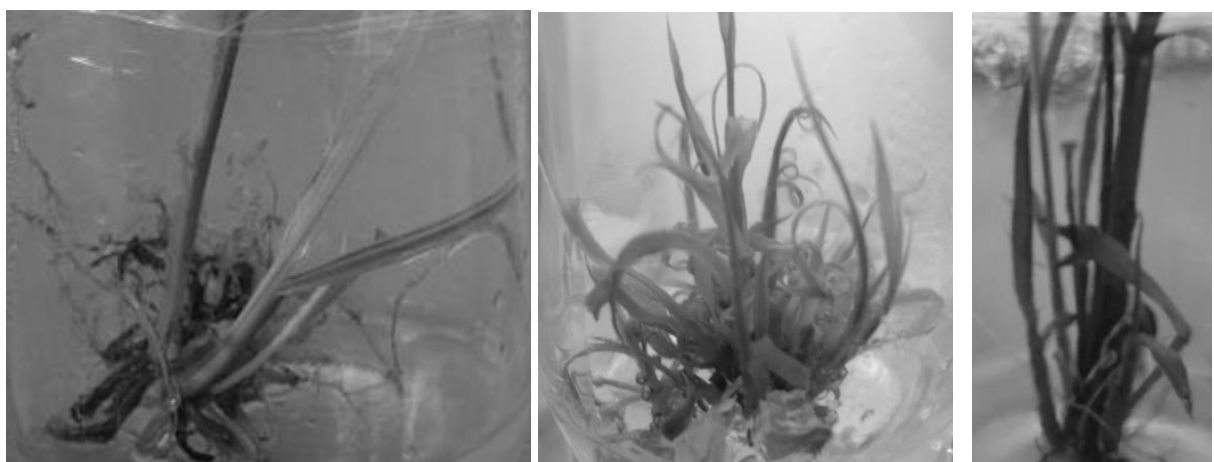
Keterangan:

^{*)} Dalam media seleksi kanamisin 150 mg l⁻¹

^{**)} Transgenik putatif hasil multiplikasi

T₀ = Transgenik putatif sub kultur ke-0

T₁ = Transgenik putatif sub kultur ke-1



Gambar 3. Penampilan tunas tebu transgenik putatif

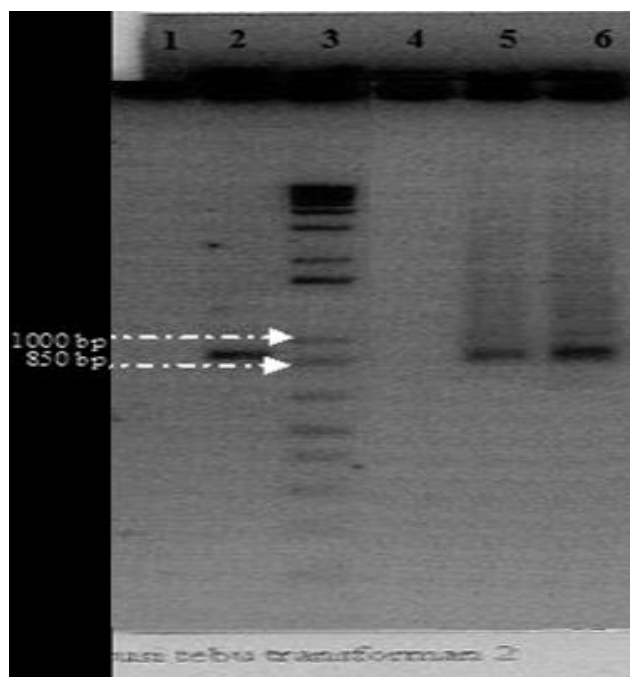
C. Analisis integrasi gen *fitase* hasil transformasi dengan teknik PCR

Plantlet yang bertahan hidup dan memiliki pertumbuhan yang baik dilakukan analisis PCR untuk mengetahui keberadaan gen yang diintroduksi dalam tanaman tebu. Hasil PCR dengan primer spesifik menunjukkan bahwa pada genom tebu tersebut telah berhasil disisipkan gen fitase yang ditunjukkan dengan pita ± 900 bp (Gambar 25). Tetapi tidak semua dari sampel tanaman tebu transforman dapat dideteksi adanya pita. Salah satu kelemahan dari ketidaksempurnaan dalam pengerjaan analisis PCR adalah timbulnya negatif semu karena kurang sempurnanya isolasi DNA; atau positif semu karena kontaminasi DNA.

PCR adalah metode cepat dan sederhana untuk mengkonfirmasi apakah tanaman transgenik putatif yang bertahan hidup dalam media seleksi merupakan transgenik atau tidak. Penelitian ini

menggunakan 2 primer spesifik (EC1 sebagai *forward* dan EC1 sebagai *reverse*) yang ditambahkan dalam reaksi PCR ekstrak DNA sampel yang diuji. DNA polimerase yang bersifat *thermostable* akan mengamplifikasi region antara 2 primer selama siklus PCR berlangsung. Amplifikasi tersebut akan menghasilkan *fragment* yang dapat memprediksi ukuran yang setara dengan jumlah pasangan basa antara 2 primer dalam transgen. Ukuran dari *fragment* tersebut dapat diamati pada agarose yang telah diberi ethidium bromida. Transgen (fitase bakteri) yang berhasil masuk dalam genom tanaman tebu akan dapat dideteksi pita ukuran ± 900 bp (Gambar 4).

Hasil PCR memperlihatkan adanya pita ukuran 900 bp pada plantlet tebu dengan aktivitas fitase tinggi. Pita ukuran 9000 bp tidak terdapat pada klon-klon tebu non transgenik (Tabel 3).



Keterangan:

- 1 = Kontrol negatif (air)
- 2 = Kontrol + (At. GV 2260)
- 2 = Ladder 1 kb
- 3 = cv. PA 175; V3₁₂ non transgenik)
- 4 = PA 175 transgenik putatif ; V3T₃
- 5 = PA 175 transgenik putatif ; V3T₈

Gambar 4. Hasil elektroforesis PCR tebu dengan primer spesifik EC1 dan EC3

Tabel 3. Aktivitas fitase dan PCR plantlet non transgenik dan transgenik putatif *)

Kode Sampel	Aktivitas fitase (U.ml ⁻¹)	PCR	Kode Sampel	Aktivitas fitase (U.ml ⁻¹)	PCR
V3 ₁	0.056 R	-	V3T ₁	0.108 Tg	-
V3 ₂	0.051 R	-	V3T ₂	0.104 Tg	-
V3 ₃	0.057 R	-	V3T ₃	0.110 Tg	Pita 900 bp
V3 ₄	0.064 R	-	V3T ₄	0.080 S	-
V3 ₅	0.044 R	-	V3T ₅	0.096 S	-
V3 ₁₀	0.049 R	-	V3T ₆	0.090 S	-
V3 ₁₁	0.068 R	-	V3T ₇	0.048 R	-
V3 ₁₂	0.055 R	-	V3T ₈	0.068 R	Pita 900 bp
V3 ₁₃	0.069 R	-	V3T ₉	0.094 S	-
V3 ₁₅	0.015R	-	V3T ₁₀	0.057 R	-
V1T ₁	0.098 S	-	V3T ₁₃	0.167 Tg	Pita 900 bp

Keterangan:

*) = Data yang disajikan pada Tabel 7 hanya cuplikan dari sebagian data
V3 = cv. PA 175 non transgenik V3T = cv. PA 175 transgenik putatif
R = aktivitas fitase rendah S = aktivitas fitase sedang
Tg = aktivitas fitase tinggi

V₃ (klon no. 12). Klon-klon tebu hasil transformasi tetapi memiliki aktivitas fitase yang rendah ternyata setelah di PCR ada yang menunjukkan pita ukuran 900 bp, dan ini mengindikasikan gen fitase telah berhasil disisipkan, namun gen tersebut tidak terekspresi.

rendah 27 % dari total sampel yang diamati. Sedangkan tanaman non transgenik (cv. PA 175) dengan aktivitas fitase rendah sebanyak 100 % dari total sampel yang diamati; dan tidak ada yang memiliki aktivitas fitase sedang-tinggi.

SIMPULAN

Lethal dosis kanamisin yang dapat digunakan sebagai penanda seleksi untuk cv. PA 175 adalah 100 mg l⁻¹ kanamisin;

- (1) Efisiensi transformasi kalus tebu (cv. PA 175) dengan gen fitase adalah 24 % .
- (2) Tanaman transgenik (cv. PA 175) hasil sub kultur ke-0 adalah 30; sedangkan hasil sub kultur ke-1 adalah 380 tanaman.
- (3) Berdasarkan analisa PCR, ditemukan pita ukuran 900 bp pada tebu hasil transformasi, sedangkan pada tebu non transgenik tidak ditemukan pita ukuran 900 bp;
- (4) Tanaman transgenik (cv. PA 175) dengan aktivitas tinggi 45 %; aktivitas fitase sedang 27 %, dan aktivitas fitase

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh proyek RAPID (No. Kontrak: 393/P4T/DPPM/RAPID/V/2004).

DAFTAR PUSTAKA

- Ananda RrWU. 2004. Studi Transformasi pada Ttebu dengan Perantara *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (pMA) serta Regenerasi Kalus Transgenik. [tesis]. Sekolah Pascasarjana. IPB.
- Gilbert RA, Gallo-Meagher M, .Comstock JC, Miller JD, Jain M, Abouzid. 2005.

- Agronomic evaluation of sugarcane lines transformation for resistance to sugarcane mosaic virus strain E. *Crop sci.* 45:2060-2067.
- Greiner R. 2005. Current biochemistry research on phytase genes in microorganism and plant. http://striweb.si.edu/inositol_conference/program/PDFs/monday_afternoon/Greiner.pdf. [11 Maret 2006]
- Keruvuo J, Rouvinen J, Hatzack F. 2000. Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel mechanism. *Biochem J.* 352:623-628.
- Maftuchah. 2003. Transformasi Genetik pada Padi indica dengan Gen *cryIA(b)* dan *cryIB* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* untuk Ketahanan terhadap Hama Penggerek Batang Kuning (*Scirpophaga incertulas* Walker). [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Naik GR. 2001. Sugarcane Biotechnology. Science Publisher, Inc. Enfield (NH), USA; Plymouth, UK. 165 hlm.
- Nasir M. 2001. Bioteknologi, Potensi dan Keberhasilannya dalam Bidang Pertanian. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 286 hlm.
- Pardal SJ. 2002. Perkembangan Penelitian Regenerasi dan Transformasi pada Tanaman Kedelai. *Bul. Agrobio.* 5: 37-44.
- Riva GA de la, Gonzales-Cabrera J, Vasques Padron R, Ayra-Pardo C. 1999. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation.
- Santosa DA, Hendroko R, Farouk A, Greiner R. 2004. A rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. *Mol. Biotechnol.* 28:113-118
- Santosa DA, Hendroko R, Farouk A, Greiner R. 2005. *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L) with bacterial phytase gene. The XXV Congress of International Society of Sugarcane Technologists, Guatemala, January 30-Februari 5, 2005.
- Skinner DZ, Muthukhrisnan S, Liang GH. Transformation: A powerful tool for crop improvement. Ed: Skinner DZ, Liang GH. *In: Genetically Modified Crop, Their Development, Uses and Risk.* New York.
- Somers DA, Olhoft PM, Makarevitch IF, Svitashchev SK. 2004. Mechanism(s) of transgene locus formation. Ed: Skinner DZ, Liang GH. *In: Genetically Modified Crop, Their Development, Uses and Risk.* New York.
- Sulandari S, Zein MSA. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi. LIPI. 125 hlm.
- Wilmink A, Dons JJM. 1993. Selective agent and marker genes for use in transformation of monocotyledoneous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:165-185.